

实验研究

扶正化癥方影响肝脏胶原生成的拆方配伍研究

刘成海* 王晓玲* 王臻楠* 刘平* 顾宏图* 胡义扬*

摘要 将扶正化癥方拆分为扶正组、化癥组、虫草组、丹参组及丹参加虫草组。制备各组含药血清,分离培养大鼠肝星状细胞,观察含药血清对培养星状细胞增殖活化、I型胶原蛋白及其mRNA表达的影响。复制二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化模型,以全方及拆方组治疗,观察模型大鼠肝脏羟脯氨酸(Hyp)含量与胶原沉积的变化。结果各组含药血清均可抑制星状细胞的增殖和活化,其中化癥药效果最明显;各组含药血清均可抑制星状细胞I型胶原mRNA及其蛋白的生成,以扶正组效果最佳。对DMN模型肝纤维化的治疗中,以全方组降低肝组织Hyp含量与胶原沉积最为明显,化癥药与扶正药配伍后减轻胶原生成作用增强,全方具有较好的综合效果。说明扶正化癥方有较好的抑制星状细胞增殖与胶原基因表达作用,是该方抗肝纤维化作用的重要机理,其中扶正药重在抑制胶原生成,化癥药长于抑制星状细胞增殖,而全方具有综合效果。

主题词 中药配伍 肝/药物作用 @ 扶正化癥方

炎症与纤维化是慢性肝炎的两大病理特征,抗肝纤维化是防治慢性肝炎的重要治疗措施^[1]。扶正化癥319方是我所研制的抗肝纤维化中药复方,长期的临床观察和实验研究均表明有良好的抗肝纤维化作用^[2,3]。该方主要由益精补虚与活血化癥两类药物组成,为了研究该方组成药物的配伍作用机理,我们将该方以主要治法、主要药物两个层次拆方,复制二甲基亚硝胺(DMN)大鼠肝纤维化模型,分离培养肝纤维化胶原生成关键细胞——肝星状细胞,观察了全方与各拆方组对模型大鼠肝脏胶原生成与沉积,全方与各拆方组含药血清对培养肝星状细胞活化增殖与胶原基因表达等的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物:Wistar 雄性大鼠,SPF级,由上海中医药大学动物实验中心提供。

1.1.2 药物:扶正化癥319方由虫草菌丝、丹参、桃仁、松黄、七叶胆等组成,上海中华制药厂协助制成流浸膏,每克浸膏含生药8.16g。扶正组由虫草菌丝、松黄等组成,化癥组由丹参、桃仁等组成,丹参组、虫草菌

丝组、丹参加虫草菌丝组,各拆方组中的药物用量与全方组中单味药用量一致。

1.1.3 主要试剂:DMN,美国Aceros公司产品。羟脯氨酸标准品(Hyp)为日本ナヌライウスケ(NACALAI)株式会社产品。199培养基(M199)购自Gibco BRL公司。Nycodenz、鼠尾I型胶原购自Sigma公司。Pronase E购自Merck公司。总蛋白试剂盒购自Bio-Rad公司。兔抗鼠I型胶原购自Calbiochem公司。单克隆小鼠抗人 α -平滑肌actin(α -SMA)抗体购自Dako公司。RT-PCR反应试剂盒与PCR标志物购自Promega公司。焦碳酸乙二酯、硫氰酸胍、饱和酚/氯仿混合物、琼脂糖购自上海生工工程公司。小牛血清、辣根过氧化物酶标记IgG抗体(IgG-HRP)购自上海华美公司。 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶核苷酸($[^3\text{H}]$ TdR, 1148GBq/mmol),购自中国科学院上海原子能研究所,其余试剂为国产或进口分析纯。

1.1.4 引物:引物设计按参考文献^[4],由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 肝星状细胞的分离及培养:按本所常规方法进行^[3],即先以D-Hank液原位灌流肝脏,继以0.1%链酶蛋白酶E、0.015%胶原酶原位消化肝脏。肝脏细胞悬液经12%Nycodenz 1450g、4℃、20分钟离心,获取肝星状细胞。台盼蓝染色细胞活力为98%,细胞鉴定依据相差显微镜下富含脂滴的细胞形态与结蛋白免疫细胞化学染色阳性,细胞纯度为90%,细胞得率为 $(2\sim5)\times10^7$ 个/肝。细胞以含10%小牛血清的M199培养,原代细胞长满单层后,传一代培养。

1.2.2 药物血清的制备:根据我们既往方法^[3],以3.75g生药/60kg大鼠体重(相当于60kg临床病人等体重10倍量)灌胃,间隔2小时2次给药,再1小时后,自后腔静脉采血,离心分离血清。对照组给予生理盐水。56℃、30分钟灭活。

1.2.3 模型制备:参照Alakkok方法^[6]。生理盐水稀释DMN为0.05%(vol/vol)浓度,以10 μ l DMN/kg大鼠体重的剂量,腹腔注射,每日1次,每周连续3天,共4周。

基金项目:国家中医药管理局青年基金(97Y007)

* 上海中医药大学肝病研究所,上海市零陵路530号(200032)

收稿日期:2000-02-08;修回日期:2000-05-29

1.2.4 培养细胞增殖试验: $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 掺入法, 24 孔板传一代培养的肝星状细胞长至近单层时, 以含 10% (v/v) 药物血清的 M199 温育 24 小时, 掺入 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ (90.5 $\mu\text{Bq}/\text{孔}$), 24 小时后收集细胞, 测定 cpm 值。

1.2.5 细胞培养上清 I 型胶原含量测定: 参照参考文献方法^[7], 传一代肝星状细胞经药物血清温育 48 小时后, 分别收集培养上清及细胞层。ELISA 法测定上清中 I 型胶原含量, 即以不同浓度 I 型胶原标准品及样品分别包被酶标板, 先以 I 型胶原抗体结合, 继之 IgG-HRP 孵育, 邻苯二胺显色, 酶标仪上读取 OD₄₉₂ 值, 随机软件计算标准曲线与样本含量。Bio-Rad 总蛋白试剂盒测定细胞层总蛋白。胶原含量以 ng/mg 细胞层总蛋白表示。

1.2.6 细胞 α -SMA 染色: 药物温育同上时间后, 吸弃上清, 细胞层免疫细胞化学 PAP 法染色 α -SMA,

表 1 扶正化瘀方及其拆方药物血清对肝星状细胞增殖和活化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	$[^3\text{H}]\text{TdR}$ 掺入 (cpm/well)	α -SMA 阳性光密度值
对照组	4	10024.63 $\pm$ 1975.22	119.35 $\pm$ 10.37
全方组	4	5329.23 $\pm$ 737.14**	82.67 $\pm$ 7.04**
扶正组	4	6381.07 $\pm$ 1367.07*	65.32 $\pm$ 3.64**
化瘀组	4	2796.00 $\pm$ 910.67**	41.01 $\pm$ 9.16**
虫草组	4	4605.65 $\pm$ 964.58**	68.20 $\pm$ 8.19**
丹参组	4	4245.20 $\pm$ 1092.90**	47.49 $\pm$ 6.44**
丹参加虫草组	4	4642.55 $\pm$ 917.15*	77.99 $\pm$ 9.93**

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 扶正化瘀方及其拆方药物血清对肝星状细胞 I 型胶原表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	蛋白含量 (ng/mg 细胞层总蛋白)	mRNA 表达量 [% $\alpha_2(\text{I})/\text{GAPDH}$]
对照组	5	87.79 $\pm$ 15.34	94.62 $\pm$ 10.23
全方组	5	58.61 $\pm$ 8.57**	78.10 $\pm$ 9.42*
扶正组	5	19.47 $\pm$ 4.06**	59.13 $\pm$ 8.90**
化瘀组	5	46.52 $\pm$ 9.8**	79.08 $\pm$ 9.96*
虫草组	5	61.21 $\pm$ 19.12*	76.62 $\pm$ 10.98*
丹参组	5	37.46 $\pm$ 11.24**	79.83 $\pm$ 9.94*
丹参加虫草组	5	66.61 $\pm$ 11.78*	64.51 $\pm$ 10.03*

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 3 扶正化瘀方及其拆方对模型肝脏 Hyp 与胶原沉积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数	Hyp ($\mu\text{g}/\text{g}$ 肝组织)	胶原染色光密度值
正常组	6	283.7 $\pm$ 43.2**	0.3317 $\pm$ 0.0697**
模型组	9	453.2 $\pm$ 30.6	1.2984 $\pm$ 0.2459
全方组	9	312.2 $\pm$ 46.1**	0.3763 $\pm$ 0.0232**
扶正组	9	352.3 $\pm$ 52.4**	0.7549 $\pm$ 0.1305*
化瘀组	9	379.5 $\pm$ 80.3*	1.1359 $\pm$ 0.2944
丹参加虫草组	9	359.9 $\pm$ 41.8*	0.7168 $\pm$ 0.0852*

与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

MPIAS-500 图象分析系统分析阳性染色光密度值。

1.2.7 培养细胞 I 型前胶原 mRNA 表达检测: 药物温育细胞 48 小时后, 异硫氰酸胍/酚/氯仿一步法自细胞中提取总 RNA^[8]。以 RT-PCR 试剂盒, 根据说明书, 进行样本的 cDNA 合成与扩增。即将 1 μg RNA、50 pmol/L $\alpha_2(\text{I})$ 前胶原或 GAPDH 引物分别加入反应管中 (含 10 mmol/L dNTPs 1 μl , 25 mmol/L MgSO_4 2 μl , AMV 逆转录酶 5 U, TfiDNA 多聚酶 5 U, AMV/Tfi 5 $\times$ 缓冲液 10 μl)。而后在 PCR 扩增仪上进行以下反应: (1) 48 $^\circ\text{C}$ 、45 分钟, 1 个循环; (2) 94 $^\circ\text{C}$ 、2 分钟, 1 个循环; (3) 94 $^\circ\text{C}$ 、30 秒, 60 $^\circ\text{C}$ 、1 分钟, 38 $^\circ\text{C}$ 、2 分钟, 30 个循环; (4) 68 $^\circ\text{C}$ 、7 分钟, 1 个循环。反应结束后取 5 μl PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳、紫外透射反射仪下观察, 并将图象摄入计算机, 图象分析 $\alpha_2(\text{I})$ 前胶原灰度值, GAPDH 灰度值作为内参照扣除。

1.2.8 病理染色: 肝组织经中性甲醛缓冲液固定, 石蜡包埋, 丽春红胶原染色, 图象分析阳性染色光密度值。

1.2.9 肝组织 Hyp 含量测定: 采用 Jamall 法^[9]。其方法, 每份标本称取湿肝 100 mg, 加入 2.5 ml 双蒸水, 4 $^\circ\text{C}$ 匀浆。以等体积 12 N HCl 105 $^\circ\text{C}$ 水解 18 小时, 过滤, 取水解液 100 μl 烘干。另取 Hyp 标准品 0.2~1.6 μg , 设为反应标准对照管。经与氯铵 T 等溶液反应, 558 nm 测定反应液 OD 值, 计算标准曲线回归方程及样品 Hyp 含量。肝组织 Hyp 含量以 “ μg Hyp/g 肝组织” 表示。

1.2.10 统计方法: 双侧 t 检验。

2 结果

2.1 含药血清对培养肝星状细胞增殖和活化的影响: 与对照组相比, 全方组及其拆方各组肝星状细胞内 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 掺入量和 α -SAM 阳性光密度均显著降低, 且均以化瘀组最低。见表 1。

2.2 含药血清对培养肝星状细胞 I 型胶原分泌与 mRNA 表达的影响: 全方组及其拆方各组 I 型胶原含量及其 mRNA 表达均显著低于对照血清组, 均以扶正组最低。见表 2 (图略)。

2.3 药物对模型大鼠肝脏 Hyp 含量与胶原沉积的影响: 模型组肝脏 Hyp 含量与胶原沉积较正常大鼠明显增加, 而全方组、扶正组与丹参加虫草组有依次强弱的明显抑制作用。见表 3。

3 讨论

肝纤维化是多种慢性肝病发展至肝硬化的必经病理过程, 存在于诸多慢性肝病中。这些疾病类似于中医的“症积”, 往往迁延缠绵, 具有正气耗损、瘀血阻络等

病理变化。扶正化瘀方立足于“症积”的“血瘀邪盛”和“精亏正虚”这两个关键因素,采用丹参、桃仁等活血化瘀,虫草菌丝、松黄等益精补虚,临床观察与实验研究均表明该方有良好的抗纤维化作用^[2,3]。

肝星状细胞受肝损伤刺激后,发生“活化”^[1],表型上转化为肌成纤维样细胞,表达 α -SMA,脂滴减少;功能上一是细胞分裂增殖旺盛,总体数量增多;二是细胞个体的胶原等细胞外基质的生成能力提高,并沉积于肝脏而形成肝纤维化。因此,星状细胞是肝纤维化发生发展的细胞学基础,抑制肝星状细胞活化是抗肝纤维化的重要环节。“药有个性之特长,方有合群之妙用”。既往研究证实扶正化瘀 319 方有抑制肝星状细胞活化、抗肝纤维化的良好作用^[3],但在影响细胞活化的增殖与胶原生成等环节中,不同治法的药物有何作用特点? 药物配伍后会发生什么变化? 本文从组方的两类不同治法功效的基本药物组——扶正与化瘀及其基本药物组的主要药物配伍等两个层次进行拆方配伍,体外试验发现,化瘀组抑制星状细胞增殖作用最强,使细胞总体数量减少, α -SMA 表达也减少。而扶正药则主要作用在细胞个体的胶原基因表达与蛋白生成功能之环节,两组之主药丹参与虫草合用,或两组药物组合成全方后,对细胞增殖与胶原生成的作用均有改变,而位于扶正与化瘀组单独的作用之间。整体试验以全方减轻胶原生成作用最好,这可能因为体内 Hyp 生成及其胶原沉积是星状细胞增殖与胶原合成等功能变化的综合结果。这种组方配伍的综合作用,一方面可减轻某些药物配伍的强烈作用,防治可能出现的副作用,体现攻补兼施、扶正驱邪的效果;另一方面发挥组方间的优势互补,在多环节多位点起作用。至于其配伍变化的化学物质基础,则需进一步研究。此外本实验

也说明,体外血清药理学方法与整体实验结果趋势大致一致,可在一定程度上反映出复方及其配伍在人体内的药效作用,并进一步证实扶正化瘀方抗肝纤维化的主要作用机理在于抑制肝星状细胞的增殖与胶原基因的表达。

参考文献

- 1 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis, Mechanisms and treatment strategies. N Engl J Med, 1993, 328(25):1828-1835.
- 2 刘平,刘成,胡义杨,等.扶正化瘀 319 方治疗肝炎后肝硬化的临床观察.中国中西医结合杂志,1996,16(8):459-462.
- 3 刘成海,刘成,刘平,等.抗肝纤维化中药复方血清药理学方法探讨.中国实验方剂学杂志,1998,4(2):16-19.
- 4 Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, et al. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats. Effect of losartan and spironolactone. Hypertension, 1995, 26(1):101-111.
- 5 徐列明,刘成,刘平,等.一种稳定和高产的星状细胞分离法.细胞生物学杂志,1995,117(3):14-16.
- 6 Ala-Kokko L, Pihlajaniemi T, Myers J, et al. Gene expressions of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat. Biochem J, 1987, 244(1):75-79.
- 7 Rennard SI, Berg R, Martin GR, et al. Enzyme-linked Immunoassay (ELISA) for connective tissue components. Anal Biochem, 1980, 104(1):205-214.
- 8 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162(1):156-159.
- 9 Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. Anal Biochem, 1981, 112(1):70-75.

《高等医学院校选用教材(供成人教育中医药专业 中西医结合专业使用)》介绍

该教材为我国第一套专供中医药成人教育尤其是全日制中医成人教育使用的教材,也是我国第一套中西医结合教材。教材共 31 种,分别为:中医学导论、中国医学史、中医藏象学、中医病因病机学、中医防治学、中医诊断学、方剂学、中药学、针灸学、推拿学、中医内科学、中医骨伤科学、中医外科学、中医妇科学、中西医结合内科学、中西医结合儿科学、中西医结合妇产科学、内经教程、伤寒论教程、金匱要略教程、温病学、中医各家学说、中药药理学、中医耳鼻喉科学、中医肛肠病学、中医皮肤病学、中医眼科学、中西医结合急诊学、中西医结合传染病学与流行病学、中西医结合临床研究思路与方法学。首批推出的《中国医学史》《中医防治学》《中医病因病机学》《内经教程》《伤寒论教程》《中医眼科学》于今年 8 月正式出版,其余各种教材陆续出版,并将于 2001 年 2 月底全部出齐。

该教材特点:(1)鲜明的时代特点:教材吸收了新中国成立 50 年来中医药研究的新进展、新技术和新成果,具有一定的创新性。(2)学科间联系的特点:教材把不同的学科置于中医和中西医结合整体学术体系中,注重学科间的联系,避免了学科的割裂和内容的重复。(3)理论联系实际的特点:教材注重理论与临床的结合,重点突出具有实用价值的基本理论和基本技能的介绍。(4)成人教育的特点:教材在内容取舍、结构体系、写作方法等方面,针对成人而设定,强调科学思维和创新精神的培养。每章前有“目的要求”、“重点内容”,每章后有“复习思考题”,书后附“模拟试题及答案”。(5)开本新颖:教材选国际标准教材开本(大 16 开),靠切口处较宽,便于学生记笔记。该教材可供中医成人高等教育中医药专业、中西医结合专业学生使用,也可作为自学考试应试人员、广大中医药基层工作者以及中医药爱好者的学习参考书。

本套教材由科学出版社出版,地址:北京东黄城根北街 16 号,邮政编码:100717,邮购电话:(010)

64017892、64000246,传真(010)64019574。

(广告编号:200010-17)

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

A Clinical Observation on Treating 17 Cases with Osteoporosis by Yi Shen Zhuang Gu He Ji

Gong Ling, Wang Mingyue, Cao Junqing, et al.

51 cases of osteoporosis were put on clinical trial in our OPD and randomly assigned to TCM treatment group (N=17), TCM control group and blank group. The total effective rate in the TCM treatment group obtained was 94.1% and the significantly effective rate achieved 88.2%. After the treatment, the density of the osseous tissue increased by 3.4%, main symptoms improved markedly, the serum calcium increased and the urine pyridine phenol decreased. All the findings were superior than that in the rest two groups. This composite is effective and safe (no side reactions) and worth put into large sale production.

Authors' add: Xuanwu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053

Key words: osteoporosis/TCM therapy @Yi Shen Zhuang Gu He Ji

(Original article on page 606)

Ultrastructural Study on Apoplema in Termination of Early Pregnancy by Pai Pei Tang and Mifepristone

Wang Qing, Zhao Hong, Wang Shilin, et al.

To elucidate the mechanism of Pai Pei Tang in combination with mifepristone in termination of early pregnancy, samples of apoplema (5 each) were collected from the Pai Pei Tang group, mifepristone group, Pai Pei Tang and mifepristone group (N=68) and routine artificial abortion group (N=22). We found that atrophy of the decidua and chorion was the utmost in the Pai Pei Tang and mifepristone group under the electron microscope. The result suggested that Pai Pei Tang could induce degenerative and atrophic changes in the decidua and affect the chorion directly.

Authors' add: Gynecology department, Sino-Japanese Friendship Hospital, Beijing

Key words: decidua/ultrastructure chorion/ultrastructure @Pai Pei Tang

(Original article on page 612)

A Study on Fu Zheng Hua Yu Fang and its Ingredients on Production of Collagen in the Liver

Liu Chenghai, Wang Xiaoling, Wang Zhennan, et al.

To explore the effect of Fu Zheng Hua Yu Fang and its ingredient (s) on collagen production we cultured the astrocytes isolated from the dimethyl nitrosamine-induced rat fibrosis model in serum with the extract of the complete

prescription and its ingredient (s) and observed their effect in treating the model rats. The ingredients included those for strengthening the body resistance, those for removing stasis, that of Cordyceps, that of Radix Salviae Miltiorrhizae and that of Radix Salviae Miltiorrhizae plus Cordyceps. The results showed that though inhibition of proliferation and activation of the astrocytes was found in all the groups, the effect of the extract of drugs for removing stasis was the strongest. Similarly, inhibition of production of collagen type I and expression of its mRNA was found in all the groups while the effect of drugs for strengthening the body resistance was the strongest. In treating the model rats, the complete prescription was the strongest in reducing the collagen deposition and hydroxyproline content. Combination of drugs for removing stasis with those for strengthening body resistance could further reduce the formation of collagen. The prescription proved to be a comprehensive one in inhibiting collagen production.

Authors' add: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, Shanghai 200032

Key words: compatibility of TCM drugs liver/pharmacological action @ Fu Zheng Hua Yu Fang

(Original article on page 620)

A Quantitative Analysis of 5-hydroxytryptamine and Norepinephrine Content in the Brain, Hypophysis and Adrenals in Cold-deficiency Rats Administered with Drugs Warm and Hot in Properties

Li Liang, Liu Guozhen, Liang Yuehua

Content of the neurotransmitters 5-Hydroxytryptamine (5-HT) and Norepinephrine (NE) in the neurons of the brain and adrenals and in the nerve fibers of the hypophysis after administration of drugs warm and hot in properties in the cold-deficiency rats were studied immunohistochemically and fluorimetrically. The results showed that both drugs for warming yang and replenishing qi could similarly increase the content of norepinephrine and decrease the content of 5-hydroxytryptamine in the neurons in the brain and in the nerve fibers of the hypophysis. Their content in the adrenal medulla did not show significant change.

Authors' add: Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054

Key words: cold deficiency syndrome/TCM treatment warming yang and supplementing qi, cold deficiency/metabolism

(Original article on page 623)